

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: 80106503.8

22 Anmeldetag: 23.10.80

51 Int. Cl.<sup>3</sup>: **C 12 N 15/00**  
**A 61 K 31/70, A 61 K 39/00**  
**A 61 K 9/50, A 01 K 67/00**  
**A 01 H 1/00, C 12 N 5/00**  
**C 12 N 1/16**

30 Priorität: 23.10.79 DE 2942780

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
29.04.81 Patentblatt 81:17

84 Benannte Vertragsstaaten:  
BE CH DE FR GB IT LI NL SE

71 Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V.  
Bunsenstrasse 10  
D-3400 Göttingen(DE)

72 Erfinder: Hofschneider, Peter Hans  
Bavariaring 12  
D-8000 München 2(DE)

72 Erfinder: Wong, Tai-Kin  
Guardinstrasse 44  
D-8000 München 70(DE)

72 Erfinder: Nicolau, Yves-Claude  
Leonhard-Stinnes-Strasse 48  
D-4330 Mülheim Ruhr(DE)

74 Vertreter: Rauh, Peter A., Dr.  
Siebertstrasse 4 Postfach 86 07 67  
D-8000 München 86(DE)

54 Eukaryotische Zellen, eukaryotische Protoplasten und vielzellige eukaryotische lebende Organismen mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel eingebrachter DNA, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Gen-Produkten, zur Immunisierung und zur Behebung genetisch bedingter Defekte.

57 Eukaryotische Zellen, eukaryotische Protoplasten und vielzellige eukaryotische lebende Organismen mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel eingebrachter DNA, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Gen-Produkten, zur Immunisierung und zur Behebung genetisch bedingter Defekte.

EP 0 027 662 A1

PATENTANWÄLTE

0027662

SIEBERTSTRASSE 4 · 8000 MÜNCHEN 86 · PHONE: (089) 47 40 75  
CABLE: BENZOLPATENT MONCHEN · TELEX 5-29 453 VOPAT D

u.Z.: P 849 EP (Vo/Ra/ger)

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

zur Förderung der Wissenschaften e.V.

3400 Göttingen, Bunsenstraße 10

---

" Eukaryotische Zellen, eukaryotische Protoplasten und vielzellige eukaryotische lebende Organismen mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel eingebrachter DNA, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Gen-Produkten, zur Immunisierung und zur Behebung genetisch bedingter Defekte "

---

Priorität: 23. Oktober 1979, Bundesrepublik Deutschland,  
Nr. P 29 42 780.3

---

Die Erfindung betrifft eukaryotische Zellen, eukaryotische Protoplasten und vielzellige eukaryotische lebende Organismen mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel eingebrachter DNA, die die genetische Information in Form nützlicher Gen-Produkte exprimieren können, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Gen-Produkten, zur Immunisierung und zur Behebung genetisch bedingter Defekte.

Lipidvesikel stellen annähernd kugelförmige Gebilde dar, deren Wandung aus einem System von mindestens einer Membran aus Lipidmolekülen besteht. Zur Zeit sind drei verschiedene Arten von Lipidvesikeln bekannt, nämlich multilamellare Lipidvesikel (MLV), auch als Liposomen bezeichnet, kleine unilamellare Lipidvesikel (SUV) sowie große unilamellare Lipidvesikel (LUV). Die Herstellung, die Eigenschaften und die Verwendung dieser Lipidvesikel ist u.a. von G. Poste,

- 1 D. Papahadjopoulos und W.J. Vail, Lipid Vesicles as Carriers for Introducing Biologically Active Materials into Cells, Methods in Cell Biology, Bd. 14 (1976), S. 33 - 71, sowie R.E. Pagano und J.N. Weinstein, Ann. Rev. Biophys. 5 Bioeng., Bd. 7 (1978), S. 435 bis 468, beschrieben. In diesen beiden Übersichtsartikeln ist auf umfangreiche weitere Literatur verwiesen worden.

Es ist bekannt, daß Warmblüterzellen, z.B. Säugetierzellen, 10 in vitro und in vivo eine große Anzahl von Lipidvesikeln ohne cytotoxische Wirkungen aufnehmen. Da die verschiedensten Stoffe im Inneren von Lipidvesikeln oder zwischen den Vesikelmembranen eingeschlossen werden können, kann die Aufnahme von Lipidvesikeln bestimmter Zusammensetzung durch Zellen 15 eine Möglichkeit zur Modifizierung der zellulären Zusammensetzung und zum Einführen nicht-permeabler biologisch aktiver Stoffe in die Zelle eröffnen; vgl. G. Poste, D. Papahadjopoulos und W.J. Vail, a.a.O. und G. Gregoriadis, The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine, 20 The New England Journal of Medicine, Bd. 295 (1976), S. 704 bis 710, und R.E. Pagano und J.N. Weinstein, a.a.O.

So ist z.B. bekannt, Inositolhexaphosphat enthaltende unilamellare Lipidvesikel in das Zellinnere von Erythrocyten 25 einzubringen; vgl. K. Gersonde und C. Nicolau, Blut, Bd. 39 (1979), S. 1 bis 7. Ferner ist bekannt, daß Metaphase-Chromosomen, die das HGPRT-Gen bzw. das AMP-Pyrophosphat-Phosphoribosyltransferase-Gen ( $aprt^+$ ) tragen, mit Liposomen in Zellen überführt werden können, die HGPRT bzw.  $aprt$ -negativ sind. Die Überführung läßt sich durch Selektionierung 30 der wenigen HGPRT bzw.  $aprt$ -positiv gewonnenen Zellen nachweisen; vgl. A.B. Mukherjee u. Mitarb., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 75 (1978), S. 1361 - 1365, und M. Wigler u. Mitarb., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 76 (1979) 35 S. 1373 bis 1376. Es ist auch bekannt, daß Polioviren Typ I bzw. die replikationsfähige RNA dieser Viren mit Hilfe von Lipidvesikeln in Poliovirus-resistente Ovarienzellen des chinesischen Hamsters überführt werden. In diesem Fall wird

1 die Überführung durch Nachweis der Virusproduktion erbracht;  
vgl. T. Wilson u. Mitarb., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,  
Bd. 74 (1977), S. 3471 bis 3475, und T. Wilson u. Mitarb.,  
Cell, Bd. 17 (1979), S. 77 bis 84.

5

Auch die Boten-RNA (m-RNA) für Kaninchenglobin ist mit Lipid-  
vesikeln (LUV) in Mäuse-Milzlymphocyten überführt worden,  
in denen dann die Synthese von Kaninchenglobin zu beobachten  
ist; vgl. G.J. Dimitriadis, Nature, Bd. 274 (1978), S. 923  
10 bis 924. Die Verwendung von RNA hat allerdings den Nachteil,  
daß sie schwer zu reinigen ist und in gereinigtem Zustand sehr  
viel leichter der Hydrolyse unterliegt als DNA.

Das bakterielle selbst replikationsfähige Plasmid pBR322  
15 kann mit Hilfe von Liposomen in E. coli eingeführt werden. Es  
repliziert sich in E. coli und kann durch die Nachkommenbak-  
terien des Empfängerbakteriums, die nun die Resistenzmarker  
des pBR322 Plasmids zeigen, nachgewiesen werden; vgl. R.T.  
Fraley u. Mitarb., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 76 (1979),  
20 S. 3348 bis 3352. DNA-haltige Liposomen sind in den Kern der  
Protoplasten der Pflanze Vigna sinensis eingeführt worden;  
vgl. P.F. Lurquin, Nucleic Acids Research, Bd. 6 (1979),  
S. 3773 bis 3784. Es ist auch bekannt, daß Liposomen durch  
Injektion im lebenden Organismus zur Fusion mit Zellen dieses  
25 Organismus gebracht werden können.

Der Einschluß von Plasmid-DNA (pMB9) in Lipidvesikel (LUV) ist  
ebenfalls bekannt; vgl. G.J. Dimitriadis, Nucleic Acids Research,  
30 Bd. 6 (1979), S. 2697 bis 2705.

1 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eukaryotische Zellen,  
eukaryotische Protoplasten und vielzellige eukaryotische le-  
bende Organismen mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel einge-  
brachter einsträngiger oder doppelsträngiger DNA von Prokary-  
5 onten oder Eukaryonten zur Verfügung zu stellen mit dem Ziel  
der unmittelbaren Gen-Expression, d.h. der Synthese von nütz-  
lichen Gen-Produkten in den Zellen, und zwar in einer Menge,  
die deren einfache Erkennung, Anreicherung und Isolierung er-  
möglicht. Im Unterschied zu bisherigen Verfahren der Gen-  
10 Überführung (Gen-Transformation) soll es erfindungsgemäß mög-  
lich sein, die Gen-Produkte nach bekannten Methoden festzu-  
stellen und zu gewinnen, ohne daß die Zellen, welche die  
DNA-haltigen Lipidvesikel erhalten haben, von den übrigen Zel-  
len selektioniert werden müssen. Außer den primären wertvol-  
15 len Gen-Produkten (Proteine in Form von Enzymen, Virusanti-  
gene, Peptidhormone, biologisch aktive Polypeptide usw.)  
sollen auch sekundäre Gen-Produkte gewonnen werden können,  
die durch die enzymatische Leistung der primären Gen-Produkte,  
wie z.B. Enzyme, synthetisiert werden.

20

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eukaryotische Zell-  
Linien zur Verfügung zu stellen, die nicht nur unmittelbar,  
sondern durch stabile Inkorporation der mittels Lipidvesikel  
eingeführten DNA auf die Dauer in Form ihrer Nachkommenzellen  
25 bestimmte wertvolle Gen-Produkte synthetisieren.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, durch Einführung  
von DNA mittels Lipidvesikeln in vielzellige eukaryotische le-  
bende Organismen ohne deren Integrität durch größere Eingrif-  
30 fe zu gefährden, die Produktion bestimmter Gen-Produkte zu  
veranlassen, z.B. die Bildung von Antigenen zwecks "Selbst-  
immunisierung", die Bildung von Antikörpern, oder die Bildung  
von Gen-Produkten zur zeitweiligen oder bleibenden Behebung  
genetisch bedingter Mängel, Defekte oder Krankheiten.

35

- 1 Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, DNA enthaltende  
Lipidvesikel in das Cytoplasma von eukaryotischen Proto-  
plasten aus Pflanzen einzuführen, um auf diese Weise in  
der Pflanze wertvolle Produkte, z.B. Proteine, zu bilden  
5 und nach Überführung der DNA in den Zellkern durch zell-  
eigene Mechanismen zu genetisch neuen Pflanzenrassen zu ge-  
langen. Auch *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa*  
und deren Protoplasten mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel  
eingebrachter DNA können erfindungsgemäß zur Verfügung gestellt werden.
- 10 Es wurde völlig überraschend festgestellt, daß nach dem  
Einführen von DNA mittels Lipidvesikel in das Cytoplasma  
von eukaryotischen Zellen, d.h. isolierte Zellen pflanzli-  
chen, tierischen oder menschlichen Ursprungs, eukaryotische  
15 Protoplasten oder Zellen von vielzelligen eukaryotischen  
lebenden Organismen, unmittelbar, nämlich innerhalb weniger  
Stunden die Produktion der entsprechenden Gen-Produkte  
festzustellen ist. Ebenso überraschend ist, daß es nach dem  
Einbringen von DNA-haltigen Lipidvesikeln in vielzellige  
20 eukaryotische lebende Organismen im Organismus innerhalb  
kurzer Zeit zur Produktion der entsprechenden Gen-Produkte  
kommt. Es war bisher nicht bekannt, daß DNA aus prokaryoti-  
schen oder eukaryotischen Quellen in eukaryotischen Systemen  
sofort und unmittelbar nach dem Einbringen der DNA-haltigen  
25 Lipidvesikel, zur Expression gebracht werden konnte. Der Me-  
chanismus der Transkription und Translation von DNA in pro-  
karyotischen und eukaryotischen Systemen ist noch nicht voll-  
ständig aufgeklärt.
- 30 Als eukaryotische Zellen kommen für die Erfindung praktisch  
alle üblichen Zellen und Zell-Linien unterschiedlichen Ur-  
in Betracht  
sprungs, wie HeLa-Zellen (Mensch), L-Zellen (Maus), Rous  
Sarcom-Zellen (Huhn), Vero-Zellen (Affe), Nieren-Zellen  
(Affe, Rind, Schwein) sowie primäre Zellkulturen, die direkt  
35 aus beliebigen Organismen, wie z.B. Maus, Ratte, Huhn, Affe,  
Wachtel, Hamster, Kaninchen, Rind oder Schwein, gewonnen

1 werden. Besonders bevorzugt sind diploide Zellen, die in Gewebekulturen möglichst hohe Generationszahlen erreichen. Ebenso kommen in Frage Zellen und Protoplasten aus z.B. Tabakspflanzen, Getreidepflanzen, *Saccharomyces cerevisiae* oder  
5 *Neurospora crassa*. Als vielzellige eukaryotische lebende Organismen kommen Pflanzen, Tiere oder Menschen in Frage.

Als DNA-Material aus prokaryotischen oder eukaryotischen Quellen kommen biochemisch gereinigte Gesamt-DNA einer Zelle oder eines Organismus, insbesondere aber hieraus angereicherte Fraktionen (Gen-Fragmente) in Frage. Einsträngige und doppelsträngige DNA, insbesondere spezifische DNA, steht heute nach Replikation in Plasmiden, Phagen oder Viren in beliebigen Mengen zur Verfügung. Vorzugsweise kann Plasmid- und Virus-DNA (Vektoren) verwendet werden, die ihrerseits wiederum  
15 bestimmte Spender-DNA aus anderen Organismen beinhalten kann. Dieses Verfahren kommt insbesondere deshalb in Frage, weil hierdurch gewünschte DNA angereichert werden kann. Insbesondere kommen aus den Vektoren herausgeschnittene Gen-Fragmente in Frage, welche codogene DNA-Sequenzen für das gewünschte Gen-Produkt enthalten. Es ist keine notwendige Voraussetzung für die Erfindung, daß die in den Lipidvesikeln eingebrachte DNA nach der Fusion mit dem Zellen oder den Zellen lebender Organismen die Fähigkeit zur  
25 Selbstreplikation hat. DNA kann auch mittels reverser Transkription aus RNA hergestellt werden. Es ist ebenfalls möglich, chemisch hergestellte DNA-Sequenzen entweder für sich allein oder nach Kopplung an natürliche oder auf andere Weise gewonnene DNA, z.B. in Plasmiden, zu verwenden.

30

Die Herstellung der DNA-enthaltenden Lipidvesikel und ihr Einbringen in eukaryotischen Zellen, eukaryotische Protoplasten und vielzellige eukaryotische lebende Organismen erfolgt nach üblichen bekannten Methoden. Insbesondere werden Lipidvesikel nach den von G. Poste, D. Papahadjopoulos und W.J. Vail, a.a.O., sowie R.E. Pagano und J.N. Weinstein,  
35

L

1 a.a.O., angegebenen Verfahren in die Zellen, Protoplasten  
oder Organismen eingebracht. Vielzellige eukaryotische  
lebende Organismen, wie Tiere und Menschen, werden DNA  
enthaltende Lipidvesikel durch parenterale Injektion, bei-  
5 spielsweise intravenös, intramuskulär, subkutan, intra-  
peritoneal oder durch Injektion in bestimmte Organe, z.B.  
intratestikulär, appliziert. In Pflanzen können die DNA-  
haltigen Lipidvesikel in die Gefäße systemisch, z.B. die Leitbündel  
oder Siebröhren, eingebracht werden.

10

Mit den Zellen können nach der Fusion mit DNA-haltigen  
Lipidvesikeln wertvolle primäre Gen-Produkte, wie Antikör-  
per, Enzyme, wie  $\beta$ -Lactamase, zelluläre, bakterielle oder  
virale Antigene, wie Tumorantigene, H-Antigene der Salmonel-  
15 len, Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBsAg), Anti-  
gene von Tollwut-Virus oder Maul- und Klauenseuche-Virus,  
hergestellt werden. Es können im Prinzip  
auch Produkte hergestellt werden, die durch die hinterein-  
ander geschaltete Syntheseleistung eines oder mehrerer  
20 Enzyme gebildet werden, deren genetische Information durch  
die Lipidvesikel in die Zellen verbracht wurde. Dasselbe  
gilt analog für vielzellige Organismen, deren Zellen mit  
DNA-haltigen Lipidvesikeln zur Fusion gebracht wurden.

25

Was die Zellen betrifft, so kommen folgende Anwendungen in  
Frage:

- a) In erster Linie die Möglichkeit, das gewünschte Gen-  
Produkt sofort zu synthetisieren, ohne daß sich die ein-  
gebrachte DNA selbst replizieren muß, und ohne daß die  
30 Replikation und Vermehrung dieser Zellen abgewartet wer-  
den muß;
- b) infolge der hohen Effizienz des DNA-Transfers durch  
Lipidvesikel können leicht Zellen isoliert werden, wel-  
che die DNA so in ihrem Genom verankert haben, daß die  
35 DNA erblich weitergegeben werden kann und zur ständigen  
Synthese des gewünschten Gen-Produktes führt. Nach dem



1       bisherigen Stand der Wissenschaft, d.h. bei den üblichen  
Transformations-Verfahren, wäre höchstens zu erwarten,  
daß eine unter etwa 1 Millionen Zellen die gewünschte  
neue Eigenschaft enthält.

5.       Was vielzellige lebende Organismen betrifft, so können z.B.  
Tiere zur Bildung von Antikörpern gegen Krankheiten ge-  
bracht werden, die durch Parasiten, Bakterien oder Viren verursacht wer-  
den. Im Bereich der Humanmedizin können Erbdefekte, wie  
10   Galactosämie, Lesch-Nahan-Syndrom, Ahorn-Syrup-Krankheit,  
Hyperargininaemie, Hämophilie A und B oder Muskeldystrophie  
behandelt werden. Ebenso können Krankheiten, deren Behand-  
lung die intrazelluläre Synthese von Proteinen im Organis-  
mus selbst erforderlich macht, therapiert werden. Durch  
15   Fusion von Zellen eines lebenden eukaryotischen Organismus  
mit DNA-haltigen Lipidvesikeln kann ein Mangel an einem Pro-  
tein, z.B. einem Peptidhormon oder einem Enzym, beseitigt  
oder der Schutz gegen virale Infektion (durch Interferon-  
produktion) erhöht werden..

20       Das Verfahren zur Herstellung der DNA-haltigen Lipidvesikel  
besteht im allgemeinen darin, daß bei üblichen pH-Werten,  
vorzugsweise einem pH-Wert von etwa 7, in wäßrige Lösungen  
bei Temperaturen, bei denen Lipidvesikel stabil sind, vor-  
25   zugsweise um 35 bis 37°C, wasserunlösliche polare Lipide  
(sogenannte amphipathische Lipide), z.B. Phospholipide,  
entweder allein oder als Lipidgemisch, wie ein Phospho-  
lipid, häufig Eilecithin, Cholesterin und ein elektrisch  
geladenes Amphiphil, wie Stearylamin (positive Ladung)  
30   oder Dicetylphosphat (negative Ladung), in unterschiedlichen  
Molverhältnissen, gewöhnlich im Bereich von 6 : 3 : 1 bis  
5 : 5 : 0,5, mit DNA-Material gemischt werden. Sodann werden  
anschließend, z.B. durch Ultraschall-Behandlung, Lipidve-  
sikel gebildet, die ohne weiteres Zutun das DNA-Material  
35   einschließen. Der erhaltenen DNA-haltigen Lipidvesikel-  
suspension werden erfindungsgemäß eukaryotische Zellen oder  
Zellkulturen oder eukaryotische Protoplasten als Kulturen

- 1 zugesetzt. Diese werden nach Routinemethoden angelegt.  
Vor der Zugabe der DNA-haltigen Lipidvesikelsuspension  
wird das Kulturmedium teilweise oder ganz entfernt. Nach  
einer Anzahl von Stunden wird wiederum die Lipidvesikellö-  
5 sung entfernt und neues Kulturmedium zugegeben. Nach etwa  
16 bis 24 Stunden kann in den Zellen bzw. Protoplasten  
eine hinreichende Menge des gewünschten Gen-Produktes  
nachgewiesen werden.
- 10 Als Nachweismethoden für die synthetisierten Gen-Produkte  
kommen bekannte Verfahren, wie mikrobiologischer Nachweis,  
Spektralphotometrie, radioimmunologische, virologische  
und enzymatische Verfahren in Frage. Alle diese Verfahren  
sind in wissenschaftlichen Standardwerken veröffentlicht. Als  
15 Isolierungs- und Reinigungsmethoden für die Gen-Produkte kom-  
men ebenfalls bekannte Verfahren, wie Chromatographie, Aus-  
scheidung, Elektrophorese oder Reaktion mit Antigenen oder  
Antikörpern, in Frage. Auch diese Verfahren sind in wissen-  
schaftlichen Standardwerken veröffentlicht.
- 20 Zur Immunisierung von Tieren und Menschen oder zur Produk-  
tion von Antigenen oder Antikörpern können die DNA-haltigen  
Lipidvesikel in Form üblicher Injektionspräparate nach üb-  
lichen Methoden parenteral appliziert werden, z.B. subkutan,  
25 intravenös, intramuskulär oder intraperitoneal. Die DNA-  
haltigen Lipidvesikel können auch unmittelbar in Organe  
injiziert werden. Es ist klar, daß die Herstellung der DNA-  
haltigen Lipidvesikelpräparate in diesem Fall unter steri-  
len Bedingungen erfolgen muß. Injektionspräparate enthalten  
30 eine ausreichende Menge der gewünschten DNA-haltigen Lipid-  
vesikel in üblichen Verdünnungsmitteln, z.B. physiologischer  
Kochsalzlösung. Die DNA-haltigen Lipidvesikelpräparate  
können ein einziges Mal oder in einem Abstand von Stunden  
oder Tagen mehrmals injiziert werden. Die verwendete Menge  
35 der DNA-haltigen Lipidvesikel, die Tier oder Mensch appli-  
ziert wird, ist so bemessen, daß die gewünschte Immunisie-  
rung oder die Produktion von Antigenen oder Antikörpern zur  
Isolierung und Gewinnung ausreichender Mengen erfolgt.

1 Die Beispiele erläutern die Erfindung.

### B e i s p i e l 1

10  $10 \mu\text{Mol}$  Phosphatidylcholin (gereinigt nach W.S. Singleton  
5 u. Mitarb., Journal of American Oil Chemist's Society,  
Bd. 42 (1965), S. 53) und Phosphatidylserin hoher Reinheit  
aus Rinderhirn im Molverhältnis 9 : 1 werden in 10 ml Chloro-  
form p.a. gelöst. Die erhaltene Lösung wird im Stickstoff-  
strom bei  $36^\circ\text{C}$  zur Trockene eingedampft.

10

2  $\mu\text{g}$  DNA des  $\beta$ -Lactamase-Gens (vgl. J.G. Sutcliffe, Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 75 (1978), S. 3737 bis 3741)  
werden in 10 ml eines wäßrigen Tris-Histidin-NaCl-Puffers  
(25 mM Tris-HCl, 2 mM Histidin, 145 mM NaCl; pH 7,4) gelöst.  
15 Die erhaltene Lösung wird zu den Lipiden gegeben und das Ge-  
misch wird 30 Minuten bei  $35^\circ\text{C}$  unter Stickstoff als Schutz-  
gas mit einem Branson-Ultraschallgerät Typ B-12 derart mit  
Ultraschall behandelt, daß kein wesentlicher Abbau der DNA erfolgt.

20 Die erhaltene DNA-haltige Lipidvesikelsuspension wird nun  
2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  mit HeLa-Zellen inkubiert. Zu diesem  
Zweck werden die HeLa-Zellen zunächst mit 20 ml Eagle's  
Minimal Essential Medium (EMEM) ohne Serum gewaschen. Sodann  
werden 4 ml der DNA-haltigen Lipidvesikelsuspension ( $10 \mu\text{Mol}$ )  
25 zu  $10^7$  gewaschenen HeLa-Zellen gegeben.

Nach der Inkubation wird die Lipidvesikelsuspension von den  
HeLa-Zellen dekantiert. Die HeLa-Zellen werden zweimal mit  
Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und so-  
dann mit 20 ml EMEM versetzt, das 10 % foetales Kälberserum  
30 enthält.

In gleicher Weise werden anstelle von HeLa-Zellen Hühner-  
embryo-Fibroblasten sowie in einem weiteren Versuch L-Zellen  
35 in gleicher Menge verwendet.

- 1 Die Genexpression in den HeLa-Zellen, Fibroblasten und L-Zellen wird spektrophotometrisch sowie mikrobiologisch verfolgt. Nach 16 bis 24stündiger Inkubation bei 37°C werden  $10^7$  Zellen in üblicher Weise trypsinisiert, sodann bei 270 x g zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag (das "Pellet") wird zum Aufbrechen der Zellen mit Ultraschall behandelt. Aliquots des Zellextrakts werden mit  $10^{-4}$  molarer Cephalosporin 87/312 Lösung, d.h. einer Lösung, die 51,6 µg/ml des Cephalosporins enthält (vgl. C.H. O'Callaghan u. Mitarb., Novel Method for Detection of  $\beta$ -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Bd. 1 (1972), S. 283 bis 288), 30 Minuten bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Änderung der Absorptionsspektren der Reaktionsgemische wird mit einem Cary 17 Spektrophotometer aufgezeichnet. Das Maximum bei 386 nm nimmt ab und gleichzeitig erscheint ein neues Maximum bei 482 nm. Dies ist ein Beweis für das Vorliegen von  $\beta$ -Lactamase im Reaktionsgemisch, die den  $\beta$ -Lactamring des Cephalosporins geöffnet hat.
- 20 Der mikrobiologische Test zur Bestimmung der Anwesenheit von  $\beta$ -Lactamase, für die das Gen codiert, wird folgendermaßen durchgeführt:
- 25  $10^6$  Ampicillin-empfindliche Zellen von E.coli C 600 werden mit 0,5 ml des Zellextrakts in Gegenwart von 30 µg/ml Ampicillin 15 bis 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ampicillin-empfindlichen Zellen vermehren sich stark im Medium. Dies ist ein Beweis für die Anwesenheit des Genprodukts  $\beta$ -Lactamase, das den  $\beta$ -Lactamring des Ampicillins geöffnet und dadurch das Antibiotikum inaktiviert hat.
- 30

### Beispiel 2

- Beispiel 1 wird wiederholt, jedoch werden anstelle der DNA des  $\beta$ -Lactamase-Gens 2 µg des DNA-Fragmentes verwendet, das die für HBsAg codierenden DNA-Sequenzen enthält. Die erhaltene DNA-haltige Lipidvesikelsuspension wird zu HeLa-Zellen bzw. zu Hühnerembryofibroblasten gegeben.
- 35

1 Nach mindestens 18stündigem Inkubieren der behandelten Zellen bei 37°C wird das Kulturmedium mittels des Radioimmuntests auf die Gegenwart von HBsAg untersucht. Das Ergebnis des Radioimmuntests zeigt die Gegenwart von HBsAg an.

5 Das DNA-Fragment, das die für HBsAg codierende DNA enthält, kann nach der von P.Valenzuela u. Mitarb., Nature, Bd. 280 (1979), S. 815 bis 819, beschriebenen Methode, erhalten werden.

10 Das HBs-Antigen kann durch bekannte biochemische Verfahren, z.B. Sedimentation oder Dichtegradientenzentrifugation, gereinigt werden.

15 B e i s p i e l 3

Beispiel 2 wird wiederholt, jedoch wird als DNA ein Plasmid verwendet, welches das Gen für das Hepatitis core Antigen (HBcAg) enthält.

20 Das Ergebnis des Radioimmuntests zeigt die Gegenwart von HBcAg an.

In gleicher Weise können Plasmide verwendet werden, welche Gene für Wachstumshormone, Insulin, Somatostatin (chemisch  
25 synthetisierte codogene Sequenzen), Angiotensin II oder Interferon enthalten. Durch den Radioimmuntest oder geeignete biologische Verfahren lassen sich diese Gen-Produkte nach kurzer Zeit nachweisen.

30 B e i s p i e l 4

Produktion von HBsAg in Kaninchen

Gemäß Beispiel 2 hergestellte Lipidvesikel, die die für HBsAg codierende DNA enthalten, werden in 4 ml physiologi-  
35 scher Kochsalzlösung suspendiert und Kaninchen intravenös in die Ohrvene injiziert. Bis zum 7. Tag werden täglich

1 Serumproben entnommen. Außerdem werden an ausgewählten Tagen  
Tiere getötet und Leberproben untersucht. Aus den Leberproben  
wird das Cytoplasma nach bekannten Methoden gewonnen. Im  
Radioimmuntest läßt sich das HBs-Antigen nachweisen.

5 Der Hauptzweck dieses Verfahrens ist allgemein betrachtet,  
darin zu sehen, Tiere durch Produktion von Antigenen und an-  
schließende Immunreaktion, d.h. Bildung von spezifischen  
Antikörpern, gegen Virus- und andere infektiöse Erkrankungen  
10 zu immunisieren.

15

20

25

30

35

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Eukaryotische Zellen mit einem Gehalt an durch Lipid-vesikel eingebrachter DNA.
2. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA einsträngig ist.
3. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA doppelsträngig ist.
4. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA prokaryotischen Ursprungs ist.
5. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eukaryotischen Ursprungs ist.

- 1 6. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine durch reverse Transkription aus RNA hergestellte DNA ist.
- 5 7. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine ganz oder teilweise chemisch erzeugte DNA ist.
- 10 8. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine an ein Plasmid angekoppelte DNA ist.
- 15 9. Eukaryotische Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine an ein Virus-Genom angekoppelte DNA ist.
- 20 10. Eukaryotische Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen Zell-Linien sind.
- 25 11. Eukaryotische Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen primäre Zellkulturen sind.
- 30 12. Eukaryotische Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen pflanzliche Zellen sind.
- 35 13. Eukaryotische Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen Protoplasten aus Pflanzen oder Bäckerhefe sind.
14. Eukaryotische Zell-Linien, gekennzeichnet durch einen Gehalt an in die Ausgangszellen durch Lipidvesikel eingebrachter DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 9.



- 1 15. Vielzellige eukaryotische lebende Organismen mit einem Gehalt an durch Lipidvesikel eingebrachter DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
- 5 16. Organismen nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus eine Pflanze ist.
17. Organismen nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ein Tier ist.
- 10 18. Organismen nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ein Warmblüter ist.
19. Organismen nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ein Säuger ist.
- 15 20. Organismen nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ein Mensch ist.
- 20 21. Verfahren zur Herstellung eukaryotischer Zellen mit einem Gehalt an für mindestens ein Gen-Produkt codierender DNA, dadurch gekennzeichnet, daß man DNA-haltige Lipidvesikel gemäß Anspruch 1 bis 9 in die Zellen einbringt.
- 25 22. Verfahren zur Herstellung vielzelliger eukaryotischer lebender Organismen mit einem Gehalt an mindestens für ein Gen-Produkt codierender DNA, dadurch gekennzeichnet, daß man DNA-haltige Lipidvesikel gemäß Anspruch 1 bis 9 in den Organismus einbringt.
- 30 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus ein Tier verwendet und die DNA-haltigen Lipidvesikel parenteral appliziert.
- 35 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Warmblüter verwendet.

- 1     25. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß  
man als Organismus Säuger verwendet.
- 5     26. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß  
man als Organismus Menschen verwendet.
- 10    27. Verfahren zur Herstellung von Gen-Produkten, dadurch  
gekennzeichnet, daß man in die eukaryotischen Zellen oder  
eukaryotischen Protoplasten DNA-haltige Lipidvesikel gemäß  
einem der Ansprüche 1 bis 9 einbringt und das primäre oder  
sekundäre Gen-Produkt isoliert.
- 15    28. Verfahren zur Herstellung von Gen-Produkten, dadurch  
gekennzeichnet, daß man Pflanzen oder Tieren DNA-haltige  
Lipidvesikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 systemisch  
bzw. parenteral appliziert und aus den Pflanzen oder Tieren  
das primäre oder sekundäre Gen-Produkt isoliert.
- 20    29. Verwendung DNA-haltiger Lipidvesikel gemäß einem der  
Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung von primären oder sekun-  
dären Gen-Produkten in eukaryotischen Zellen, eukaryotischen  
Protoplasten oder vielzelligen eukaryotischen lebenden  
Organismen.
- 25    30. Verwendung DNA-haltiger Lipidvesikel gemäß einem der  
Ansprüche 1 bis 9 zur Immunisierung von Warmblütern.
- 30    31. Verwendung DNA-haltiger Lipidvesikel gemäß einem der  
Ansprüche 1 bis 9, bei denen die DNA für ein Gen-Produkt  
codiert, das eukaryotischen Zellen, eukaryotischen Proto-  
plasten oder vielzelligen eukaryotischen lebenden Organis-  
men fehlt, zur Behebung der entsprechenden genetisch be-  
dingten Defekte.



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0027662

Nummer der Anmeldung

EP 80 10 6503

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (int. Cl. 1)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
- DX	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Band 6, Nr. 12, 1979, P.F. LURQUIN: "Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts", Seiten 3773-3784  * Seite 3373, letzter Absatz; Seiten 3782-3783; Ansprüche *	1,3,4, 8,12, 13,21	C 12 N 15/00 A 61 K 31/70 39/00 9/50 A 01 K 67/00 A 01 H 1/00 C 12 N 5/00 1/16
DX	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Band 75, Nr. 3, März 1978, A.B. MUKHERJEE et al.: "Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): Carrier potential in gene transfer", Seiten 1361-1365  * Seite 1361; Zusammenfassung; Tabelle 2; Seiten 1364-1365; Diskussion *	1,3,5 10,14 21,27 29,31	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (int. Cl. 1)  C 12 N 15/00 A 61 K 9/50 31/70 39/00 67/00 A 01 H 1/00
D	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Band 6, Nr. 8, 1979, G.J. DIMITRIADIS: "Entrapment of plasmid DNA in liposomes", Seiten 2697-2705  * Seite 2702, Zeilen 7-12; Tabelle 2; Seite 2704, Zeilen 8-18 *		KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument B: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
D	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Band 76, Nr. 7, Juli 1979, R.T. FRALEY et al.: "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer", Seiten 3348-3352 ./. .	1,8, 21,27 29	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort:	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	16-01-1981	DESCAMPS	

## ABSTRACTS OF SELECTED CITATIONS

1/5/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

003172378

WPI Acc No: 1981-32924D/198119

Eukaryotic cells contg. DNA inserted via lipid vesicles - for prepn. of gene products such as enzymes, virus antigens, hormones, and for use in immunisation and elimination of genetic defects

Patent Assignee: MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN (PLAC )

Inventor: HOFSCHNEID P H; NICOLAU Y C; WONG T K

Number of Countries: 011 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 27662	A	19810429			198119	B
WO 8101153	A	19810430			198120	
DE 2942780	A	19810521			198122	
JP 56501628	W	19811112			198152	
CA 1169793	A	19840626			198430	

Priority Applications (No Type Date): DE 2942780 A 19791023

Cited Patents: 17Jnl.Ref; EP 4223

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 27662 A G

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL SE

WO 8101153 A G

Designated States (National): JP

Abstract (Basic): EP 27662 A

Eukaryotic cells contg. DNA introduced by a lipid vesicle are new..

The cells can be used in the prepn. of gene products such as proteins in the form of enzymes, virus antigens, peptide hormones,

biologically active polypeptides etc., and can be used in immunisation and in the elimination of certain genetically conditioned defects, deficiencies or disorders: The cells can be of plant, animal or human origin. In the case of plant cells it is possible to create genetically new plant species. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* cells can be used.

Title Terms: EUKARYOTIC; CELL; CONTAIN; DNA; INSERT; LIPID; VESICLE; PREPARATION; GENE; PRODUCT; ENZYME; VIRUS; ANTIGEN; HORMONE; IMMUNE; ELIMINATE; GENETIC; DEFECT

Derwent Class: B04; C03; D16; P13; P14

International Patent Class (Additional): A01H-001/00; A01K-039/00; A01K-067/00; A61K-009/50; A61K-031/70; A61K-039/00; C12N-001/16; C12N-005/00; C12N-015/00; C12P-001/00; C12P-005/00; C12R-001/64

File Segment: CPI; EngPI

?